

(9) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

(12) **Offenlegungsschrift**
(11) **DE 3927856 A1**

(5) Int. Cl. 5:
C 12 Q 3/00

(21) Aktenzeichen: P 39 27 856.5
(22) Anmeldetag: 23. 8. 89
(23) Offenlegungstag: 28. 2. 91

DE 3927856 A1

(7) Anmelder:

B.A.T. Cigarettenfabriken GmbH, 2000 Hamburg, DE

(7) Vertreter:

Schwabe, H., Dipl.-Ing.; Sandmair, K., Dipl.-Chem.
Dr.jur. Dr.rer.nat.; Marx, L., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.,
Pat.-Anwälte, 8000 München

(7) Erfinder:

Brümmer, Bernd, Dipl.-Chem. Dr., 2083 Halstenbek,
DE; Gaisser, Horst, Dipl.-Ing., 2087 Hasloh, DE;
Rittershaus, Erhard, Dipl.-Ing. Dr., 2000 Hamburg,
DE; Weiss, Arno, Dipl.-Ing., 2000 Norderstedt, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(5) Verfahren zur Prozeßführung mindestens eines Bioreaktors für pflanzliche Zellkulturen

Bei einem Verfahren zur Prozeßführung mindestens eines Bioreaktors für pflanzliche Zellkulturen, dem Inokulum, Nutrient und Nährlösung sowie gegebenenfalls Chemikalien zugeführt und nach der Fermentation die pflanzlichen Zellkulturen entnommen werden, werden die Ist-Werte für den Sauerstoff-Partielldruck, die Leitfähigkeit und den Brechungsindex ermittelt, diese Ist-Werte mit modellgestützt vorgegebenen Soll-Werten für diese Prozeßparameter verglichen und in Abhängigkeit vom Ergebnis dieses Vergleichs Akten für die optimale Beeinflussung von Prozeßparametern ver stellt, nämlich für die Drehzahl des Rührwerks, die Belüftungsrate, die Nutrient-Zufuhr und den Kopfdruck.

DE 3927856 A1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Prozeßführung mindestens eines Bioreaktors für pflanzliche Zellkulturen der im Oberbegriff des Anspruchs 1 angegebenen Gattung.

Pflanzliche Zellkulturen werden in der Pflanzenzüchtung bereits in großem Umfang angewendet; so ist beispielsweise die ungeschlechtliche Pflanzenvermehrung über Kallus-Kulturen ein Weg zur raschen Erzeugung reinerbiger Nachkommen. Andererseits können Kallus-Kulturen auch in flüssige Suspensionskulturen überführt werden, die sich ähnlich wie Mikroorganismen in Bioreaktoren vermehren lassen. An dieser Stelle können prinzipiell auch genetische Veränderungen vorgenommen werden.

Jede Zelle einer Kultur besitzt das vollständige Erbgut einer ganzen Pflanze und kann theoretisch bei geeigneter Wahl der Nährstoff- und Kulturbedingungen zur Produktion von speziellen Pflanzeninhaltsstoffen angeregt werden, die wiederum große wirtschaftliche Bedeutung sowohl in der Pharmazie wie auch in der Kosmetik und der Nahrungsmittelindustrie haben.

Die Entwicklung von Produktionsverfahren für pflanzliche Zellkulturen im großtechnischen Maßstab muß die besonderen Eigenschaften von pflanzlichen Zellen berücksichtigen, insbesondere ihre Größe, ihre Morphologie, insbesondere die Scherempfindlichkeit der Zellaggregate, die maximale Wachstumsrate, die Zeldichte, die relativ komplexen Medienansprüche, die Belüftungsrate sowie andere Parameter.

Zur Untersuchung dieser Aspekte wurde eine fünfstufige Fermentationsanlage im Produktionsmaßstab bis 75 000 Liter errichtet, die in Artikeln mit dem Titel "Großtechnische Fermentation von pflanzlichen Zellkulturen" in der Zeitschrift "Bio Engineering", 1/89, Seite 7 ff bzw. 2/89 Seite 28 ff beschrieben wurde.

Eine solche Fermentationsanlage, mit der bisher verschiedene Pflanzenzellen kultiviert wurden, wie z.B. *Echinacea purpurea*, *Rauwolfia serpentina* und andere, gliedert sich in den sogenannten "Upstream-Prozeß", also die Nährösungsvorbereitung mit kontinuierlicher Kurzzeitsterilisation, die eigentliche Fermenter-Kaskade, den Downstream-Prozeß, nämlich die Erntetechnik und die Suspensions-Aufarbeitungstechnologie, und schließlich die Medien-Ver- und Entsorgung.

Die Fermenter-Kaskade besteht aus fünf Rührkesseln mit 0,075 m³, 0,75 m³, 7,50 m³, 15 m³ und 75 m³ Bruttovolumen. Mit Ausnahme des 15 m³-Behälters, der zur Überbrückung eines Störfalles dient, werden in jeder Vorstufe ca. 10% Impfmaterial ("Inokulum") für die nächste Stufe erzeugt. Dadurch läßt sich die Flexibilität der Anlage verbessern, die für eine semikontinuierliche Betriebsführung konzipiert ist.

In dem Artikel 1/89 wird darauf hingewiesen, daß neben der üblichen meßtechnischen Ausstattung (Temperatur, pH-Wert, Druck, Sauerstoffpartialdruck) Optionen zur Einbringung von weiteren Sensoren vorgesehen sind.

In dem Artikel 2/89 werden On-Line-Messungen sowie die regelmäßige Probenentnahme für die Off-Line-Analytik erwähnt. Es werden Frischgewicht, Trocken Gewicht, Brechungsindex, Osmolalität, Redox-Potential sowie in Einzelfällen die Ausbeute an Metaboliten bestimmt.

Wie bei jedem verfahrenstechnischen Prozeß stellt auch bei einer solchen Fermentationsanlage die Analyse

des Prozeßzustandes die Grundlage von gezielten Stell eingriffen dar. Erst hierdurch werden Bedingungen für eine optimale Produktausbeute im Bioreaktor, nämlich in jedem einzelnen Rührkessel, aber auch in der Gesamtanlage, geschaffen.

Dabei müssen auch die Besonderheiten einer sterilen Prozeßführung, wie sie hier erforderlich ist, berücksichtigt werden.

Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Prozeßführung mindestens eines Bioreaktors für pflanzliche Zellkulturen der angegebenen Gattung zu schaffen, bei dem die oben erwähnten Bedingungen berücksichtigt werden. Insbesondere soll ein Prozeßführungsverfahren vorgeschlagen werden, bei dem nur relativ wenige Prozeßparameter erfaßt und geregelt werden müssen, um unter besonderer Berücksichtigung der erforderlichen Sterilität eine optimale Produktausbeute des Bioreaktors zu gewährleisten.

Dies wird erfindungsgemäß durch die im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 1 angegebenen Merkmale erreicht.

Zweckmäßige Ausführungsformen werden durch die Merkmale der Unteransprüche definiert.

Die mit der Erfindung erzielten Vorteile beruhen auf einer besonders zweckmäßigen Auswahl der zu erfassenden Prozeßparameter einerseits und der zu regelnden Prozeßparameter andererseits; denn im Prinzip kommen sowohl für die Meßtechnik als auch für die Regeltechnik eine Vielzahl von Prozeßparametern in Frage, die nur mit einem unverhältnismäßig großen Aufwand berücksichtigt werden können.

Wählt man aus dieser großen Zahl eine geeignete Kombination von nur relativ wenigen Prozeßparametern aus, so läßt sich sowohl der meßtechnische als auch der Regelungstechnische Aufwand wesentlich verringern.

Mißt man nämlich nur den Sauerstoffpartialdruck sowie die Leitfähigkeit und den Brechungsindex der Nährösung im Bioreaktor, und benutzt man die festgestellten Abweichungen von modellgestützt vorgegebenen Sollwerten zur optimalen Regelung von Stellgliedern für die Drehzahl des Rührwerkes, die Belüftungsrate, die Zufuhr an Nutrient und den Kopfdruck, so lassen sich mit relativ einfacher meß- und Regeltechnischer Hardware sehr gute Ergebnisse erzielen.

Will man die Regelgenauigkeit noch weiter verfeinern, so kann das Trockengewicht der Biomasse und/oder ihre Trübung ermittelt und ebenfalls zur Regelung herangezogen werden.

Hierbei hat man die Wahl zwischen einer On-Line-Messung der Trübung oder einer Off-Line-Messung des Trockengewichtes der Biomasse; die beiden Meßwerte hängen voneinander ab, können also ineinander umgerechnet werden.

Mißt man außerdem noch den Kohlendioxid-Gehalt des Abgases, so kann man den Kohlendioxid-Gehalt einerseits und das Trockengewicht der Biomasse bzw. die Trübung andererseits zu einem integralen Maß für die vitale Biomasse im Bioreaktor miteinander verknüpfen und dadurch eine weitere Regelgröße gewinnen.

Selbstverständlich können auch bei dieser Prozeßführung noch weitere Parameter geregelt werden; beispielsweise kann die Schaumhöhe erfaßt und die Zufuhr eines Antischaummittels entsprechend geregelt werden. Auch eine Temperaturmessung und eine entsprechende Regelung durch Wärme- bzw. Kältezufuhr sind möglich.

Bei dieser Prozeßführung wurde auch berücksichtigt,

daß der Messung von biologischen und produktspezifischen Parametern im Bioreaktor Grenzen gesetzt sind, da einerseits ein vertieftes Verständnis der Zellregulation noch weitgehend fehlt und andererseits robuste On-Line in Situ Meßsysteme für einen solchen Bioprozess und seine Produktbildung zum Teil erst in der Entwicklung sind.

Deshalb wurde auch weitgehend auf die Prozeßparameter abgestellt, die On-Line erfaßt werden können und für die bereits geeignete Sensoren zur Verfügung stehen. Dies gilt auch für die zu regelnden Prozeßparameter und ihre zugehörigen Stellglieder.

Bei Bedarf kann dieses Prozeßführungsverfahren noch während des Betriebs zur Erfassung weiterer Prozeßparameter bzw. Verwendung weiterer Regelgrößen ausgerüstet werden, um schließlich im Extremfall mittels eines mathematischen Modells zur Beschreibung von Wachstum und Produktbildung eine vollautomatische Regelung zu ermöglichen. Die Verwendung eines solchen Modells während der Kultivierung muß unter Beachtung von verschiedenen Aspekten erfolgen, nämlich Anlagenoptimierung, Beobachtung und Filterung des Prozeßzustandes, Zustands-Prädiktion des weiteren Fermentationsverlaufs, optimale Bioreaktor-Prozeßführung und schließlich die optimale Prozeßführung der aus mehreren Bioreaktoren bestehenden Fermenter-Kaskade.

Die Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen unter Bezugnahme auf die beiliegenden, schematischen Zeichnungen näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 eine Prinzipdarstellung eines einzigen Fermenter-Rührkessels, bei dem die verschiedenen Materialströme einerseits und einige Prozeßparameter bzw. Regelgrößen andererseits angedeutet sind,

Fig. 2 eine Prinzipdarstellung einer aus insgesamt fünf Fermenter-Rührkesseln bestehenden Fermentations-Kaskade mit dem zugehörigen Prozeßleitsystem, und

Fig. 3 typische idealisierte Meßsignal-Verläufe für verschiedene Prozeßparameter.

Der aus **Fig. 1** ersichtliche Fermenter wird durch einen Rührkessel gebildet, der den üblichen, beispielsweise in den beiden oben angezogenen Artikeln beschriebenen Aufbau einschließlich eines geeigneten Rührwerks hat. Diesem Fermenter werden verschiedene Materialströme zugeführt, nämlich steriles Nutrient, eine Nährlösung, die während der Zuführung kontinuierlich sterilisiert wird, was durch den Begriff "Kontisterilisation" angedeutet wird, der als Inokulum bezeichnete Impfstoff, die Prozeßluft, ein Antischaum-Mittel, mindestens eine Säure und mindestens eine Lauge.

Die produzierten Pflanzenzellen werden am unteren Ende des Fermenter-Rührkessels abgezogen, was durch den Begriff "Erntetransfer" angedeutet ist. Außerdem ist in diesem Bereich eine Probenentnahme vorgesehen.

Die im Fermenter-Rührkessel gebildete Abluft wird am oberen Ende abgezogen, und zwar über ein dort als "Aktor" bezeichnetes Stellglied. Dort ist auch ein zugehöriger Sensor angedeutet, der in diesem Fall den Kopfdruck des Fermenter-Rührkessels erfaßt.

Dieser Sensor und dieser Aktor stehen stellvertretend für eine noch zu erläuternde Reihe von Sensoren und Aktoren, die für dieses Prozeßführungsverfahren eingesetzt werden.

Fig. 2 zeigt schematisch den gesamten Aufbau der Fermentations-Kaskade, wie sie in den beiden oben angezogenen Artikeln aus "Bio Engineering" beschrieben

wird, nämlich einmal die Fermentations-Kaskade selbst mit den fünf Rührkesseln, die Volumina von 0,075 m³, 0,75 m³, 7,5 m³, 15 m³ und 75 m³ haben. Der Rührkessel mit dem Volumen von 15 m³ dient als Sicherheitsstufe.

5 Durch die Pfeile sind die Materialströme zwischen den verschiedenen Rührkesseln angedeutet, wie sie auch in den Artikeln beschrieben werden, auf die hiermit ausdrücklich verwiesen wird.

Das einen Prozeßrechner benutzende Prozeßleitsystem erfaßt die Signale der verschiedenen Sensoren, die die Ist-Werte der zugehörigen Prozeßparameter in jedem einzelnen Rührkessel, aber auch der Gesamtanlage überwachen, und zwar entweder On-Line oder Off-Line, also durch die Analyse einer Stichprobe im Labor. Die Off-Line ermittelten Ergebnisse werden über den Eingabeterminal dem Prozeßleitsystem zugeführt.

Außerdem ist eine Prozeßleitstation vorgesehen, die diese Anlage beobachtet und bedient und wiederum von dem Prozeßleitsystem über alle wesentlichen Prozeßparameter, aber auch über eventuelle Störfälle, informiert wird.

Das Prozeßleitsystem regelt wiederum die verschiedenen Akteure, also Stellglieder, die zur Regelung des Verfahrensablaufs in jedem einzelnen Fermenter-Rührkessel, aber auch in der Gesamtanlage erforderlich sind.

Im folgenden sollen zunächst die wesentlichen, bei diesem Prozeßführungsverfahren benutzten Meßgrößen erörtert werden, bevor auf die einzelnen Stellgrößen eingegangen wird.

30 Wie bereits oben erwähnt wurde, sind die drei wichtigsten Meßgrößen der Partialdruck des Sauerstoffs in dem bzw. jedem Rührkessel sowie die Leitfähigkeit und der Brechungsindex der Nährlösung in dem bzw. jedem Rührkessel.

35 Bei einem aeroben Fermentationsprozeß wird Sauerstoff zur Atmung und somit zur Energiegewinnung für alle weiteren biochemischen Prozesse verbraucht. Die Menge des benötigten Sauerstoffs hängt von der vorhandenen Biomasse einerseits und ihrer biochemischen Aktivität andererseits ab. Da sich Sauerstoff in wässrigen Medien relativ schlecht löst, können bei hohen Biomasse-Konzentrationen, ungünstigen Durchmischungsbedingungen sowie ungenügender Belüftung sehr rasch Mängelscheinungen auftreten, die sogenannte "Sauerstofflimitierung", die einer rationellen Kulturführung entgegenstehen.

40 Die Messung des gelösten Sauerstoffs in der Nährlösung liefert deshalb einen Anhaltspunkt für die Menge des Zellen zur Verfügung stehenden "Substrats" Sauerstoff.

Bei konstantem, ausreichendem Sauerstoff-Eintrag zeigt der Partialdruck des Sauerstoffs während der Fermentation von Pflanzenzellen einen zur Biomasse-Konzentration inversen Verlauf.

45 Da Mikroorganismen im allgemeinen eine erheblich größere Atmungskapazität haben als pflanzliche Zellen, gibt der Verlauf der Konzentration des gelösten Sauerstoffs außerdem noch Hinweise auf mögliche Kontaminationen, die beispielsweise auf mangelhafte Sterilisation zurückzuführen sind.

50 Als Meßsysteme für den Partialdruck des Sauerstoffs in einem Rührkessel, nämlich in der Nährlösung, kommen überwiegend membrangestützte, sterilisierbare amperometrische Elektroden (Clark-Elektroden) zur Verwendung.

55 Als Meßsysteme für den Partialdruck des Sauerstoffs in einem Rührkessel, nämlich in der Nährlösung, kommen überwiegend membrangestützte, sterilisierbare amperometrische Elektroden (Clark-Elektroden) zur Verwendung.

Der am häufigsten auftretende Störfaktor dieses Sensors ist das sogenannte "Membran-Fouling", das auf Verschmutzung der verwendeten Membranen im Lang-

zeitbetrieb zurückzuführen ist. Dadurch können geringfügige Meßfehler entstehen, denen jedoch durch rechtzeitigen Austausch der Membran begegnet werden kann.

Fig. 3a zeigt einen typischen, idealisierten Verlauf des Meßsignals für den Sauerstoff-Partialdruck PO_2 einerseits und der Konzentration X der Biomasse (auf Trockengewichtsbasis) bei der Fermentation von Pflanzenzellen andererseits.

Es läßt sich erkennen, daß der Sauerstoff-Partialdruck einen zur Konzentration der Biomasse inversen Verlauf hat.

Die Leitfähigkeit ist eine einfache Meßgröße zur Bestimmung der Konzentration salzartiger Substrate. Bei "normalen" vollsynthetischen Nährmedien, wie sie für Pflanzenzellkulturen eingesetzt werden, hängt die Leitfähigkeit nahezu ausschließlich von der Salzkonzentration im Medium ab. Eine für Pflanzenzellen übliche Nährlösung, z.B. das unter der Bezeichnung "MS-Medium" bekannte Nährmedium, weist eine Salzkonzentration von ca. 50 bis 55 mVal/l auf und hat eine Leitfähigkeit von 5,6 mS/cm. Diese Leitfähigkeit entspricht der einer 0,5% KNO_3 (50 mMol/l) Lösung allein.

Die Wasserstoffionen-Konzentration der Nährlösung beeinflußt somit die Leitfähigkeit nur in untergeordnetem Maße, solange der pH-Wert größer als 3 bleibt.

Zur On-Line-Messung der Leitfähigkeit wird eine Mehrelektrodensonde verwendet, da die zunehmende Biomasse im Fermenter bei herkömmlichen Leitfähigkeitsmeßzellen zu einer Änderung der Zellkonstanten führt.

Fig. 3b zeigt einen typischen Verlauf des Meßsignals für die Leitfähigkeit L während eines Fermentationsablaufs.

Die Messung der optischen Dichte eines Mediums ist ein Verfahren zur Bestimmung des Brechungsindex, bei dem es sich um eine stoff-, temperatur- und konzentrationsabhängige Größe handelt, die außerdem noch von der Meßwellenlänge abhängig ist.

Der Brechungsindex wird mit Refraktometern gemessen, wobei der Grenzwinkel der Totalreflektion eines Lichtstrahles beim Übergang von einem optisch dichteren Medium in ein dünneres Medium bestimmt wird.

Da der Brechungsindex wäßriger Lösungen durch organische Bestandteile, beispielsweise Zucker, wesentlich stärker beeinflußt wird als durch äquimolare Salzanteile, kann der Brechungsindex der Nährlösungen von Pflanzenzellkulturen in erster Näherung als Maß für den Zuckergehalt der Kulturbrühe angesehen werden.

Ein meßtechnisches Problem beim On-Line-Einsatz handelsüblicher Refraktometer bei der Fermentation liegt in der Verschmutzung des Meßfensters durch organische Beläge sowie in der Störung des Meßsignals durch Gasblasen. Hier müssen entsprechende Gegenmaßnahmen getroffen werden.

Fig. 3c zeigt einen typischen, idealisierten Verlauf des Meßsignals eines Sensors für den Brechungsindex n während einer Fermentation.

Auch in diese Kurvendarstellung ist die Änderung der Konzentration X der Biomasse mit der Zeit eingetragen. Auch hier ist zu erkennen, daß der Brechungsindex n einerseits und die Konzentration X der Biomasse andererseits einen inversen Verlauf haben.

Aus einer Verknüpfung der Ist-Werte für die drei Meßgrößen Sauerstoff-Partialdruck PO_2 , Leitfähigkeit L und Brechungsindex n kann man Stellsignale für Ak-

toren für die Drehzahl des Rührwerkes in dem bzw. einem Rührkessel, für die Belüftungsrate, für die Zuführung des Nutrients bzw. für die Einstellung des Kopfdruckes in dem bzw. jedem Rührkessel gewinnen.

Zur Einstellung des Kopfdruckes im Rührkessel ist ein Abluftventil vorgesehen, das in Fig. 1 durch den Begriff "Aktor" angedeutet ist.

Zusätzlich können On-Line noch weitere Prozeßparameter erfaßt werden, nämlich der pH-Wert, das Redoxpotential, die Trübung, die Fluoreszenz, der Sauerstoffgehalt des Abgases und schließlich der CO_2 -Gehalt des Abgases.

Der pH-Wert ist eine der ältesten und gebräuchlichsten Meß- und Regelgrößen in der Biotechnologie. Die meisten biologischen Prozesse laufen in pH-Wert-Bereichen zwischen 9 und 3 ab; eine Kultivierung von Pflanzenzellen ist im allgemeinen in pH-Werten zwischen 7,5 und 4 möglich. Nahezu jede Fermentation zeigt einen typischen Verlauf des pH-Wertes, so daß starke Abweichungen von diesem vorgegebenen Verlauf Indikatoren für Störungen im System sind, beispielsweise durch Kontaminationen, aber auch durch Autolyse u.ä.

Ein typischer Verlauf des pH-Wertes für die Fermentation von Pflanzenzellen ist in Fig. 3d, auch wieder in Verbindung mit der zeitlichen Änderung der Konzentration X der Biomasse, dargestellt.

Bei der Kultivierung von Pflanzenzellen wird die sterile Nährlösung bei Fermentationsbeginn im pH-Wert eingestellt; weitere Stelleingriffe sind meist nicht erforderlich.

Darüber hinaus laufen bestimmte Stoffwechsel-Vorgänge, z.B. Produktbildung, Biokonversion usw. nur innerhalb wesentlich engerer pH-Wert-Grenzen, die durch die pH-Maxima der beteiligten Enzyme vorgegeben sind, optimal ab. Hier dient der pH-Wert zusätzlich als Sollwert für die pH-Regelung zur Aufrechterhaltung eines angepaßten Milieus durch Säure- oder Laugedosierung.

Als Meßsonden für die kontinuierliche On-Line-Erfassung des pH-Wertes dienen kombinierte Glas- und Bezugselektroden (Einstabmeßketten) mit Flüssig- oder Fest-Elektrolyt-Füllung. Diese Meßfühler sind im allgemeinen robust, leicht zu eichen und problemlos zu handhaben.

Betriebsstörungen gehen oft auf Verschmutzung der Diaphragmen ("Fouling") im Langzeitbetrieb zurück. Dadurch können Meßfehler bis zu 0,5 pH-Einheiten entstehen.

Die Messung des Redoxpotentials rH wird bei aeroben Fermentationen vorwiegend durch den Verlauf des pH-Wertes und des Sauerstoff-Partialdrucks PO_2 in der Fermenterbrühe bestimmt. Die Auswertung dieses Meßsignals liefert deshalb in der Regel keine zusätzlichen Informationen. Die für die Bestimmung des Redoxpotentials rH eingesetzten Elektroden haben jedoch keinerlei Fouling-Probleme, so daß ihr Meßsignal eine gute Bewertungshilfe für ungewöhnliche Signalverläufe bei Messungen des pH-Wertes und/oder des Sauerstoff-Partialdrucks PO_2 darstellen.

Die Messung der Trübung einer Fermenterbrühe dient zur Bestimmung der aktuellen Biomasse-Konzentration und erfolgt optisch mit einem Vierstrahl-Wechselslicht-Photometer (Streulichtmessung) in Form einer Fermenter-Tauchsonde; diese Meßmethode ist auch für pflanzliche Zellkulturen unproblematisch, sofern das Medium selbst keine Feststoffe enthält und ein Bewuchs der Sonde verhindert werden kann.

Fig. 3e zeigt den typischen Verlauf der Trübung T während der Fermentierung.

Das gewonnene Meßsignal hängt von der räumlichen Ausdehnung und der Zahl der die Trübung verursachenden Teilchen in der Nährösung ab und muß durch Eichung mit der Konzentration der Feucht- bzw. Trockenmasse an Biomasse korreliert werden. Im Normalfall einer Fermenterkultur gelingt dies recht gut; dabei muß nur beachtet werden, daß sich unter Umständen durch Ausbildung von verschiedenen geformten Zellaggregaten erhebliche Unterschiede zwischen einzelnen Kulturen bemerkbar machen können.

Unter der großen Zahl von Verbindungen mit Fluoreszenz-Eigenschaften sind für die Biotechnologie nur wenige von größerer Bedeutung, wobei wohl der wichtigste biogene Fluorophor die reduzierte Form des Nicotinamid-Adenin-Dinucleotids (NAD H) ist. NAD H kommt in allen lebenden Zellen vor und hat im Stoffwechselgeschehen eine zentrale Rolle. Mit Hilfe einer Fluoreszenz-Sonde, eines sogenannten Mikrofluorimeters, sind Aussagen über Mischzeiten, die Konzentration der Biomasse, die Versorgung mit Sauerstoff und Substrat, sowie Regulationsphänomene möglich.

Das Meßsignal und seine Interpretierbarkeit sind allerdings um so besser, je homogener die zu messende Nährösung ist.

Der Sauerstoffgehalt des Abgases O₂ (ab) stellt eine wichtige Kenngröße zur Bilanzierung des Gasstoffwechsels einer Kultur dar. Bei konstanter Begasungsrate nimmt im allgemeinen der Sauerstoffgehalt mit fortgeschreitendem Kulturalter aufgrund der Zunahme der Biomasse ab.

Am Verlauf der ausgetragenen Sauerstoff-Mengen lassen sich im Vergleich mit der Begasungsrate und der jeweiligen Konzentration des gelösten Sauerstoffes Rückschlüsse auf die Effektivität des Gaseintrages (Dispersionsverhalten) ziehen und mögliche Maßnahmen zur verfahrenstechnischen Prozeßoptimierung (Kopfdruck, Drehzahl des Rührers, Belüftungsrate und Begasungssystem) einleiten.

Auch für den CO₂-Gehalt des Abgases CO₂ (ab) gilt prinzipiell das für den Sauerstoffgehalt des Abgases Gesagte. Im Gegensatz zum Sauerstoffgehalt nimmt aber der CO₂-Gehalt des Abgases mit zunehmender Biomasse zu und kann deshalb auch als indirekte Meßmethode für vitale (atmende) Biomasse eingesetzt werden.

Da der CO₂-Gehalt der Zuluft sehr gering ist und je nach Gasdurchsatz auf bis zu 5% des Abgases ansteigen kann, muß man davon ausgehen, daß praktisch die gesamte CO₂-Menge durch Atmung neu gebildet wird. Bei den üblichen pH-Werten einer Fermentation, nämlich im Bereich von 6 bis 4, läßt sich außerdem nicht von einer nennenswerten Konzentration des gelösten CO₂ ausgehen. Für physiologische Betrachtungen ist die CO₂-Konzentration des Abgases wichtiger als die Sauerstoff-Konzentration O₂, da der Meßwert nur von der Absolutmenge des Abgases (Begasungsrate) und der aktuellen Zellatmungsaktivität abhängt.

Von den verschiedenen, in Frage kommenden Meßsystemen, nämlich Infrarotmessung, Gaschromatographie, Massenspektrometer und Wärmeleitfähigkeitsdetektor, stellt die Infrarotmessung die genaueste und im Vergleich auch am wenigstens störanfällige Methode dar.

Es muß allerdings für die Entfernung von Feuchtigkeit aus dem Meßgas gesorgt werden.

Alle oben für eine On-Line-Prozeß-Analytik erwähnten Meßgrößen müssen, sofern dies möglich ist, zuvor, aber gebenenfalls auch bei laufendem Betrieb, anhand

von gezogenen Stichproben im Labor überprüft werden.

Denn auch bei erfolgreichem Einsatz von On-Line-Sensoren empfiehlt es sich, die entsprechenden Meßgrößen auch weiterhin im Rahmen der normalen Laborroutine mit zu untersuchen, da man auf diese Weise Erfahrungen bezüglich der Zuverlässigkeit der verwendeten On-Line-Systeme sammeln kann.

Zu den Meßgrößen, die parallel zum On-Line-Betrieb noch im Labor untersucht werden sollten, gehören der pH-Wert, der Brechungsindex und die Leitfähigkeit.

Zu den weiteren Prozeßparametern, die regelmäßig anhand von Stichproben im Labor untersucht werden müssen, gehören das Frischgewicht der Biomasse, das Trockengewicht der Biomasse, die Osmolalität und der Polarisationswinkel α .

Das Frischgewicht der Biomasse wird durch Wägung nach der Fest/Flüssigtrennung aus einer definierten, repräsentativen Probe ermittelt. Diese Untersuchung liefert direkte Ergebnisse in bezug auf das Wachstumsverhalten und dient zur Kontrolle der indirekten On-Line-Bestimmung der Biomasse mittels Trübungssonde.

Da der Feuchtigkeitsgehalt von Pflanzenzellen in weiten Bereichen schwanken kann, nämlich im Extremfall zwischen 85% und 97%, ist für die Mehrzahl aller quantitativen Betrachtungen die Konzentration X der Biomasse auf Trockengewichtsbasis die wertvollere Kenngröße. Darüber hinaus läßt der Wassergehalt der Zellen bzw. der Trockengewichtsanteil am Frischgewicht in einigen Fällen Rückschlüsse auf bestimmte physiologische Veränderungen der Pflanzenzellkultur zu.

Die Osmolalität Osm stellt ein Maß für die Zahl der gelösten Teilchen in einem Lösungsmittel dar. Die übliche Maßeinheit ist Mol/kg Lösungsmittel.

Die Osmolalität Osm ist eine integrale Meßgröße, d.h., es findet keine Unterscheidung nach der Art der Teilchen statt, sondern es wird ein Meßwert für alle vorhandenen Teilchen ermittelt.

Ein Spaltungs- oder Dissoziationsprozeß von Teilchen in einer Lösung führt zu einer Erhöhung der Gesamtteilchenzahl und somit zu einer Erhöhung der Osmolalität.

Ein typischer Verlauf des Wertes für die Osmolalität Osm während einer Fermentierung ist in Fig. 3f gezeigt.

Die Osmolalität der Nährösung stellt im Zusammenhang mit der Leitfähigkeit und dem Brechungsindex eine wichtige Meßgröße für die Bestimmung des jeweiligen Substrat-Zustandes dar. Ein Anstieg der Osmolalität am Kulturbeginn ist auf die Spaltung der Saccharose in Glucose und Fructose (Zuckerinversion) in der lag-Phase zurückzuführen.

Einige Lösungen chemischer Substanzen können bei der Durchstrahlung mit linear polarisiertem Licht die Ebene des polarisierten Lichtes drehen. Die Richtung und das Ausmaß der Drehung hängen von der Art der Lösung, von der Wellenlänge, sowie von der Konzentration der Lösung ab.

Das wichtigste Einsatzgebiet für dieses Meßverfahren ist die Bestimmung von Zucker in einer Lösung. Bei der Spaltung des rechtsdrehenden Rohrzuckers in rechtsdrehende Glucose und linksdrehende Fructose ändert sich der Gesamtdrehwert der Nährösung ("Inversion"). Je nachdem, in welchem Ausmaß die beiden gebildeten Monosaccharide von der Zellkultur verwertet werden, verändert sich im weiteren Kulturverlauf der optische Drehwert weiter und liefert damit Hinweise auf die Art der spezifischen Zuckeraufnahme durch die Kultur.

Fig. 3g zeigt die typische Änderung des Polarisationswinkels während der Fermentierung.

Neben diesen Meßgrößen können mit Hilfe eines Prozeßrechners weitere "Meßdaten" über den Zustand des Bioreaktors erzeugt werden. Denn für die modellgestützte Meßtechnik zur Prozeß-Überwachung und -Führung stellt die Theorie dynamischer Systeme mit dem Beobachter- und Filter-Prinzip geeignete Werkzeuge zur Verfügung. Größen, die einer direkten Messung nicht unmittelbar zugänglich sind, können so aus leicht meßbaren Größen gewonnen werden.

Aus diskontinuierlichen Meßdaten der Off-Line-Laboranalyse werden über eine Simulation weitere "On-Line-Meßdaten" gewonnen; gestörte, bzw. verrauschte Meßgrößen lassen sich idealisiert darstellen oder rekonstruieren.

Auf diese Weise erhält man sehr frühzeitig Hinweise auf Prozeßstörungen, insbesondere, wenn mittels Simulation der weitere Fermentationsverlauf als Prädiktion visualisiert werden soll.

Aus allen diesen Meßgrößen werden Regelgrößen für verschiedene Akteure gewonnen, nämlich für das Rührwerk, für die Heizung/Kühlung, für die Begasung, für den Kopfdruck, für die Einstellung des pH-Wertes, für die Nachfütterung, für die Schaumunterdrückung, für die Reaktorlogistik und schließlich für die Kaskadenlogistik.

Das Rührwerk lässt sich mittels eines Aktes für die Regelung seiner Drehzahl beeinflussen.

Heizung/Kühlung erfolgt durch entsprechende Zuführung von Dampf- bzw. Kühlwasser zum Doppelmantel des bzw. jedes Fermenters.

Die Regelung der Begasung erfolgt durch Einstellung eines entsprechenden Ventils für die Prozeßluft, wobei entweder der gesamte Gasstrom oder aber auch die Konzentration der einzelnen wesentlichen Komponenten des Gasstroms, nämlich Sauerstoff, CO₂ und Stickstoff, geregelt werden können.

Zur Regelung des Kopfdruckes dient ein Abluft-Ventil in dem bzw. jeden Fermenter (siehe auch den "Aktor" in Fig. 1).

Die Einstellung des pH-Wertes erfolgt über Vorlage-Ventile zur Dosierung der zugeführten Säuren bzw. Laugen.

Auch die Regelung der Nachfütterung erfolgt über eine Nutrient-Dosierung mittels Vorlage-Ventilen.

Schließlich wird auch die Schaumunterdrückung mittels eines Vorlage-Ventils für die Zuführung des Antischäummittels geregelt.

Zur Regelung der Reaktorlogistik gehört das Einfüllen des Nutrients bzw. der Nährlösung, gegebenenfalls in Verbindung mit einer kontinuierlichen Sterilisation, die ebenfalls über Ventile geregelt wird, der Inokulum-Transfer und schließlich der Ernte-Transfer, jeweils geregelt über Ventile.

Die Regelung der übergeordneten Kaskaden-Logistik für den Verbund aus den hier vorgesehenen fünf Fermentern führt selbsttätig den Up-Stream-Prozeß, den Down-Stream-Prozeß einschließlich Erntetechnik und Suspensionsauarbeitung sowie die Ver- und Entsorgung der verwendeten Medien.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Prozeßführung mindestens eines Bioreaktors für pflanzliche Zellkulturen, dem Inokulum, Nutrient bzw. Nährlösung sowie gegebenenfalls Chemikalien zugeführt und nach der Fer-

mentation die pflanzlichen Zellkulturen entnommen werden, bei dem

- a) die Ist-Werte mehrerer Prozeß-Parameter ermittelt,
- b) diese Ist-Werte mit vorgegebenen Soll-Werten für diese Prozeßparameter verglichen und
- c) in Abhängigkeit vom Ergebnis dieses Vergleichs Akteure für die Beeinflussung von Prozeßparametern verstellt werden, dadurch gekennzeichnet, daß
- d) der Sauerstoff-Partialdruck (PO₂), die Leitfähigkeit (L) und der Brechungsindex (n) der Mischung im Bioreaktor ermittelt werden, und daß
- e) in Abhängigkeit vom Ergebnis des Vergleichs zwischen diesen Ist-Werten und modellgestützt vorgegebenen Soll-Werten für diese Prozeßparameter die Drehzahl des Rührwerks im Bioreaktor, die Belüftungsrate, die Nutrient-Zufuhr und der Kopfdruck optimal eingestellt werden.
2. Prozeßführungsverfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als weiterer Prozeßparameter das Trockengewicht der Biomasse ermittelt wird.
3. Prozeßführungsverfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Trockengewicht der Biomasse Off-Line, also anhand einer Stichprobe ermittelt wird.
4. Prozeßführungsverfahren nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Trockengewicht der Biomasse On-Line aus der Trübung der Mischung im Bioreaktor ermittelt wird.
5. Prozeßführungsverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der CO₂-Gehalt der Abluft des Bioreaktors ermittelt wird.
6. Prozeßführungsverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß aus dem Trockengewicht der Biomasse einerseits und dem CO₂-Gehalt der Abluft des Bioreaktors andererseits ein integrales Maß für die vitale Biomasse gebildet wird.
7. Prozeßführungsverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß als zusätzlicher Prozeßparameter noch mindestens eine der folgenden Meßgrößen ermittelt wird: pH-Wert, Redoxpotential (rH), Sauerstoffgehalt des Abgases, Frischgewicht der Biomasse, Osmolalität, die Temperatur, die Schaumhöhe und der Polarisationswinkel.
8. Prozeßführungsverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich Akteure für die Heizung/Kühlung, für die Einstellung des pH-Wertes durch entsprechende Dosierung von Säuren oder Laugen, und für die Zuführung eines Antischäummittels verwendet werden.
9. Prozeßführungsverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß Akteure für die Reaktorlogistik einerseits und für die übergeordnete Kaskadenlogistik einer Fermenterkaskade andererseits verwendet werden.
10. Prozeßführungsverfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß Akteure für die Einfüllung der Nährlösung bzw. des Nutrients, für den

DE 39 27 856 A1

11

12

Inokulum-Transfer und für den Ernte-Transfer ver-
wendet werden.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

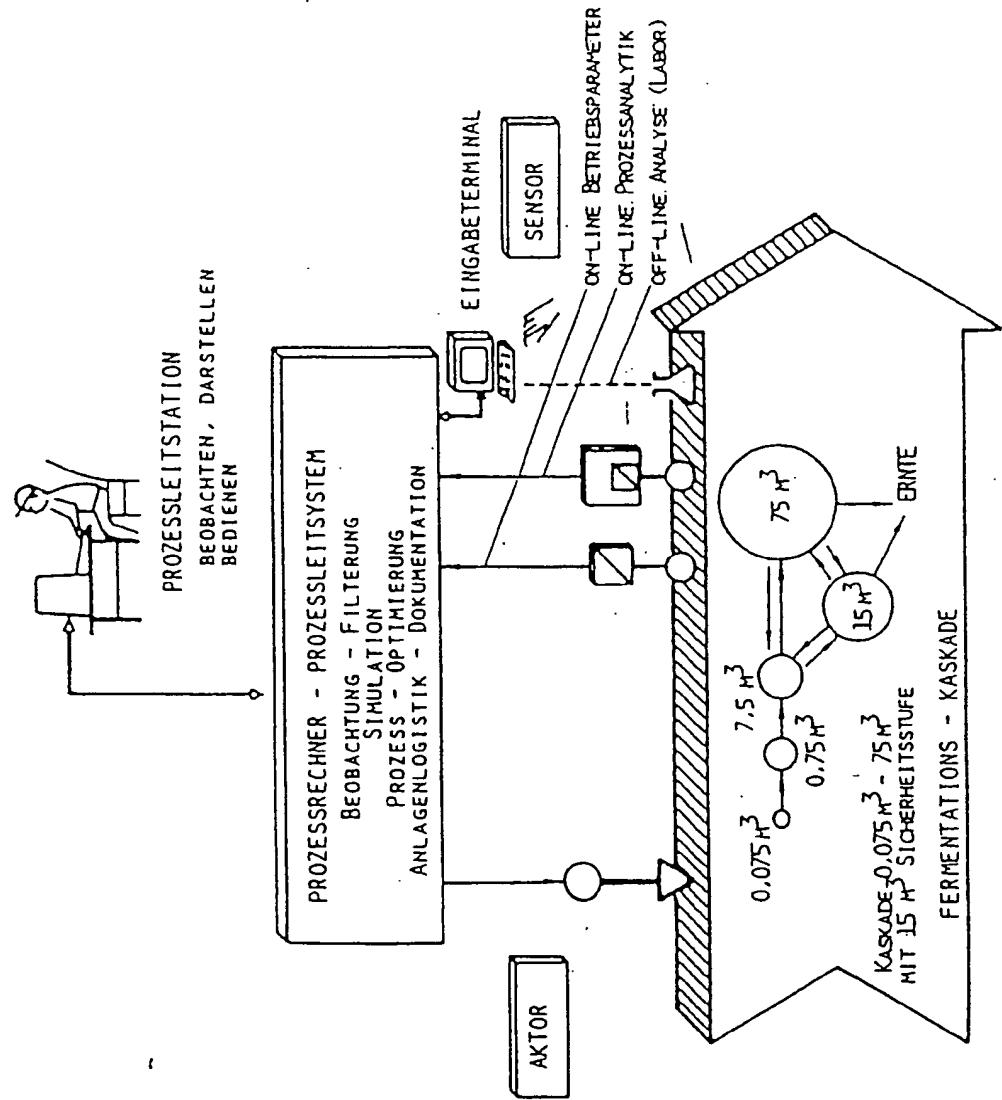
45

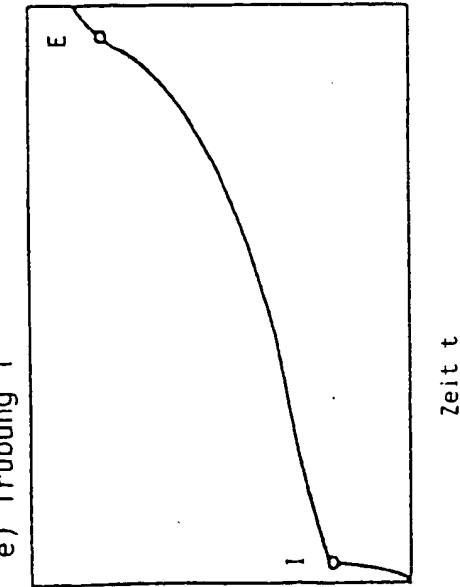
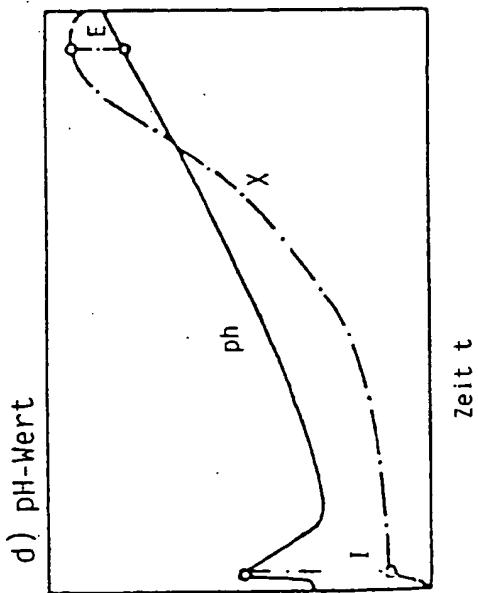
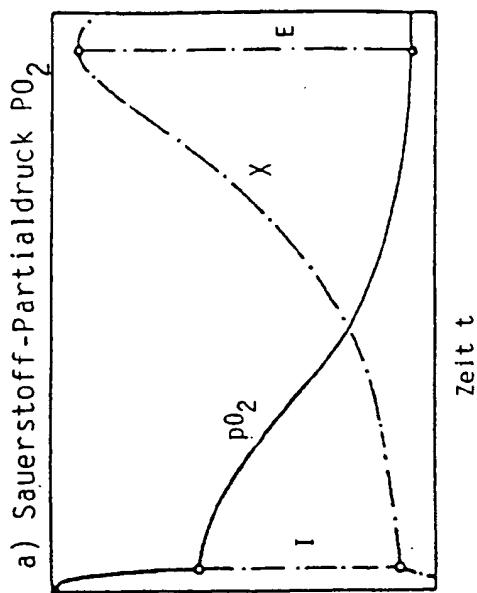
50

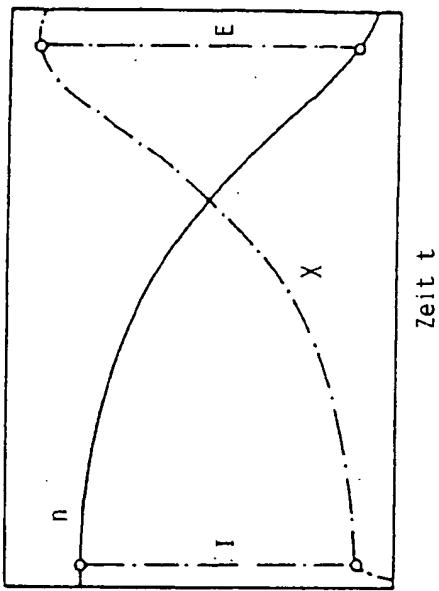
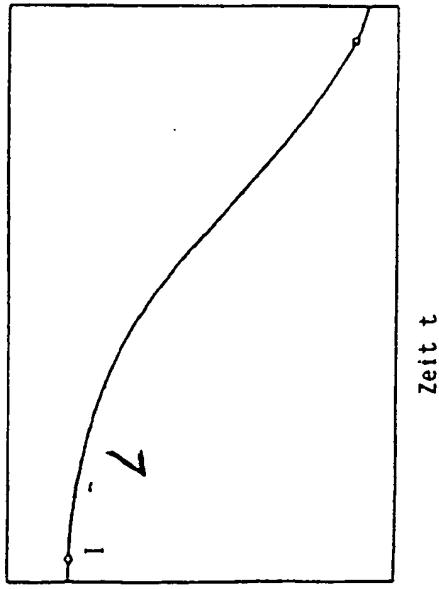
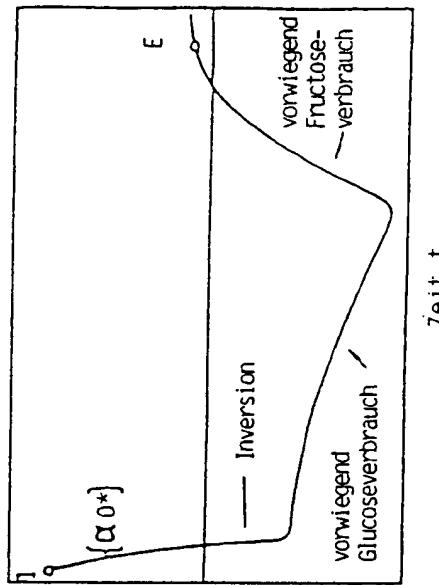
55

60

65





c) Brechungsindex n b) Leitfähigkeit L g) Polarisationswinkel α 

f) Osmalität osm

